

Inmunoglobulina (Ig) polivalente en el tratamiento de la sepsis abdominal

A. Rodríguez*, F. Palizas#, J. Neira†, B. Maskin‡, N. Raimond§, J. Alvarez¶, L. Vasta|| y colaboradores

RESUMEN

La sepsis grave mantiene una elevada mortalidad en los últimos 40 años. Múltiples intentos por moderar la respuesta inflamatoria sistémica, mediante la infusión de inmunoglobulinas (Ig), han demostrado resultados controvertidos. Los diferentes criterios de diagnóstico, la diferente población en estudio y el reducido número de pacientes, dificultan obtener conclusiones definitivas.

Objetivo: Evaluar si la infusión de Ig mejora la evolución de pacientes con sepsis abdominal.

Lugar: 7 unidades de Cuidados Intensivos Polivalentes.

Diseño: Estudio multicéntrico, prospectivo, randomizado, doble ciego.

Intervenciones: Los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir Ig (Grupo A: GA) o Placebo (Grupo B: GB) conjuntamente con el tratamiento habitual de la sepsis abdominal.

Resultados: Treinte y siete pacientes fueron incluidos en el estudio. 20 en el GA y 17 en el GB. El nivel medio de APACHE II, TISS, las disfunciones y fallas orgánicas no fueron diferentes entre los grupos. La mortalidad general fue del 16,7%, superior en el GB (29%) respecto del GA (5%) aunque tal diferencia no alcanzó significación estadística.

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren, que la infusión de Ig (Pentaglobin®) en pacientes con sepsis abdominal con foco resuelto, reduce la mortalidad al alta de la UCI. Nuevos estudios clínicos son necesarios para confirmar los presentes hallazgos.

Palabras clave: Sepsis abdominal - Inmunoglobulinas - Tratamiento

ABSTRACT

Mortality in sepsis didn't change in the last 40th years. Several clinical trials with immunoglobulin therapy, for modulation of systemic inflammatory response syndrome, have showed unclear results. It's difficult to obtain definitive conclusions because of the different diagnostic criteria used, the population studied and the few number of patients included in the studies.

Objective: To evaluate the clinical utility of Immunoglobulin in the abdominal sepsis.

Setting: Seven general ICUs in Buenos Aires.

Design: Multicenter, prospective, randomized and double-blind clinical trial.

Interventions: Patients were assigned to receive Ig (Group A: GA) or Placebo (Group B: GB) at the same time with the standard sepsis treatment.

Results: Thirty-seven patients were enrolled in the study. Twenty in the GA and 17 in GB. No statistically significant differences for APACHE II, TISS, multiorgan dysfunction and organ failure were found between the two groups. The general mortality rate was 16,7%. The mortality rate was lower (5%) in the GA versus GB (29%), but no statistically significant.

Conclusions: Our findings suggest that the supplemental immunoglobulin therapy in patients with abdominal sepsis decrease the UCI mortality. Future clinical trials are needed to confirm these results.

Key Words: Intrabdominal sepsis - Intravenous immunoglobulins - Treatment

(Listado completo al final del manuscrito)

*Servicio de Terapia Intensiva - Hospital Israelita "EZRAH"

#Servicio de Terapia Intensiva - Clínica Bazterrica

†Servicio de Terapia Intensiva - Sanatorio Otamendi

‡Servicio de Terapia Intensiva - Hospital Alejandro Posadas

§Servicio de Terapia Intensiva - Hospital Fernández

¶Servicio de Terapia Intensiva - Hospital Militar Central

||Servicio de Terapia Intensiva - Sanatorio San José

Correspondencia: Dr. Rodríguez Alejandro

Gallo 606 Torre 1 Piso 22 Dto. 6

Capital Federal (1190) - Buenos Aires

Tel: 15-4446 8943. E-Mail: ahrodri@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La mortalidad de la sepsis grave ha permanecido sin variantes en los últimos 40 años a pesar de los avances en las modalidades terapéuticas. Los pacientes críticos, especialmente aquéllos sometidos a intervenciones quirúrgicas, sufren alteraciones en la inmunidad humoral. Una significativa disminución de los niveles de IgG, IgA e IgM ha sido reportada en pacientes luego del trauma y la cirugía^{1,2}. En pacientes sépticos, la evolución favorable parece relacionarse estrechamente con los niveles de anticuerpos contra el microorganismo causante³. Por otra parte, en pacientes graves, se ha reportado una alteración de los polimorfonucleares, relacionada a trastornos en la opsonización y fagocitosis, secundarios en parte, a una disminución en los niveles de Ig y al consumo de factores del complemento⁴. Los ensayos clínicos con infusión de Ig para profilaxis y/o tratamiento en pacientes sépticos han demostrado resultados muy variables. Dominioni y col.⁵ reportaron una mejoría en la sobrevida de pacientes con la infusión de Ig, mientras que Cafiero y col.⁶ refieren una mejor evolución de los pacientes con alto riesgo de infección postquirúrgica, cuando se les administró Ig simultáneamente con los antimicrobianos. En contraposición, Gooding y col.⁷ reportan que la infusión de Ig no demostró efecto beneficioso sobre la mortalidad ni la aparición de complicaciones sépticas en niños con trauma craneal, aunque para otros autores⁸, podría prevenir el desarrollo de neumonía nosocomial en pacientes politraumatizados. Esta discrepancia de los estudios responde posiblemente a la heterogeneidad de los pacientes incluidos, a la falta de estandarización de los criterios de sepsis y al pequeño número poblacional considerado en la mayoría de ellos.

Por estas razones y a fin de evaluar el efecto de la infusión de Ig polivalente enriquecida con IgM (Pentaglobin®) en pacientes con sepsis intrabdominal, se planeó realizar un estudio prospectivo, randomizado, doble ciego, con criterios estrictos de selección e inclusión, a fin de intentar homogeneizar al máximo la población en estudio.

OBJETIVOS

Comparar la evolución de 2 grupos de pacientes con sepsis abdominal, a uno de los cuales se les infundió inmunoglobulina polivalente enriquecida (Pentaglobin®) versus placebo, conjuntamente con el tratamiento convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 5 años se controló en forma prospectiva a aquellos pacientes ingresados a las 7 UCIs parti-

Tabla 1. Criterios de exclusión de los pacientes en el estudio.

Criterios de Exclusión

- Embarazo actual
- Inmunosuprimidos graves
- Lesión irreversible de órgano no sustituible
- Coma con Glasgow 3/15
- Cardiopatía Terminal con disnea grado IV
- Patología quirúrgica con imposibilidad de resolución
- Muerte antes de las 24 de concluida la infusión de Ig

cipantes, por sepsis grave o shock séptico (según definición del consenso ACCP-SCCM 1992) de origen intrabdominal, cuya evolución no fuera superior a las 24 hs de iniciado el cuadro. La sepsis abdominal se definió como aquel paciente con SIRS⁹ y foco abdominal comprobado quirúrgicamente. Para incluir a etiologías como colangitis supurada e infección pancreática, fue condición necesaria, obtener material purulento con estudio de Gram positivo para gérmenes. En todos los casos, para ingresar al protocolo, el equipo quirúrgico actuante, así como el intensivista debieron considerar la resolución quirúrgica adecuada. En la Tabla 1 se enumeran los criterios de exclusión.

Tabla 2. Criterios utilizados para definir las disfunciones orgánicas.

Criterios para Disfunción Orgánica

| | |
|-----------------------|---|
| Cardiovascular | Necesidad de expansión para mantener TAM en ausencia de pérdidas agudas de la volemia. Necesidad de drogas vasoactivas y/o indicación aguda de digital o antiarrítmicos. |
| Respiratoria | Necesidad de oxigenoterapia. |
| Renal | Necesidad de expansión con volumen o diuréticos para mantener la diuresis. |
| Digestiva | Alteración de la bilirrubina o enzimas hepáticas Ileo o diarrea luego de 72 hs del postoperatorio. |
| Hematológica | Necesidad de Transfusión en ausencia de sangrado activo Alteraciones de la coagulación Necesidad de vitamina K y/o plasma. |
| SNC | Confusión, excitación o delirio |

Tabla 3. Criterios utilizados para definir las Fallas Orgánicas.

| Criterios para Fallas Orgánicas | |
|--|--|
| Cardiovascular | FC > 130/min TAM < 80 mmHg Arritmias graves o de difícil control IAM < de 72 hs de evolución (al menos 2 criterios) |
| Respiratoria | PaO ₂ < 50 mmHg con FiO ₂ de 0.21% PaO ₂ < 70 mmHg con FiO ₂ >0.21 y < 0.50 D(A-a) O ₂ > 200 con FiO ₂ > 50% |
| Renal | Creatinina > 2 mg% en ausencia de IRC Duplicación de las cifras de creatinina en 24 hs Terapéutica dialítica de urgencia |
| Digestiva | HDAA no varicosa Bilirrubina > 10 mg% Amilasemia > 1000 U Falc > 200 U Colecistitis alitiásica Ileo de > de 72 hs en postoperatorio Diarrea (en ausencia de diarrea crónica) |
| Hematológica | Hematocrito < 30% en ausencia de anemia crónica Leucocitos > a 30.000 o < a 3.000 Plaquetas < 80.000 |
| SNC | Glasgow < 10 en ausencia de drogas depresoras |

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Sociedad Argentina de Terapia Intensiva. El estudio multicéntrico se realizó en forma prospectiva, doble ciego, y randomizado, conformándose aleatoriamente 2 grupos: **A) Activo:** a quienes se les infundió inmunoglobulina polivalente enriquecida (Pentaglobin®) en dosis de 7 ml/kg/ día durante 5 días y **B) Control:** a quienes se les infundió placebo (albúmina al 5%) indistinguible del compuesto activo. Ambos preparados fueron provistos por Biotest Pharma (Alemania) - Biogam S.A. (Argentina), laboratorio que patrocinó el estudio. En ambos grupos se realizó la terapéutica habitual de la sepsis abdominal, según criterios del equipo tratante.

Se controló en todos los pacientes las variables demográficas (edad, sexo), el diagnóstico de ingreso, los días de estancia en la UCI y la evolución vital al egreso de la misma. Se valoró el estado de gravedad mediante el Score APACHE II¹⁰, considerándose para cada variable,

Tabla 4. Diagnósticos de los pacientes incluidos

| Diagnóstico | n | (%) |
|-------------------------|----------|------------|
| Peritonitis fecal | 19 | (51,35%) |
| Colangitis supurada | 4 | (10,82%) |
| Peritonitis purulenta | 10 | (27,03%) |
| Peritonitis apendicular | 3 | (8,10%) |
| Anexitis supurada | 1 | (2,70%) |
| Total | 37 | (100%) |

el peor valor de las primeras 24 hs de estancia en la UCI. Se controló además, diariamente y hasta el momento del alta de la UCI: el nivel de procedimientos realizados en cada paciente, mediante el Score TISS¹¹ y el desarrollo de Disfunciones y Fracazos Orgánicos a través de un Score propio (Tabla 2 y Tabla 3).

Por otra parte, se evaluó si el antimicrobiano (ATB) administrado en forma empírica al ingreso en la UCI, fue el adecuado para los gérmenes recogidos en los cultivos. (Se consideró adecuado cuando el microorganismo aislado era sensible al espectro del ATB utilizado empíricamente). Si del antibiograma surgió que el ATB empírico fue inadecuado, el paciente no fue considerado para el estudio. Aquellos pacientes con estadía menor a 5 días (periodo de infusión de la inmunoglobulina) fueron excluidos también para el análisis.

El análisis estadístico se efectuó mediante el test de "chi" cuadrado y "t" de Student para medias, considerándose valores significativos para "p" a aquellos inferiores a 0,05.

RESULTADOS

Se incluyeron 59 pacientes. 13 (22%) de estos 59, fueron excluidos por déficit en la recolección de los

Tabla 5. Características de los grupos de estudio.

| | Grupo A | Grupo B | |
|--------------------------|----------------|----------------|-----|
| Total pacientes | 20 | 17 | |
| Masculinos | 10 (50%) | 7 (41,2%) | |
| Edad Media (años) | 60 ± 16.1 | 67 ± 15.2 | PNS |
| Días de Estancia (media) | 16,4 ± 15.9 | 10,7 ± 11.2 | PNS |
| Mortalidad | 1/20 (5%) | 5/17 (29%) | PNS |
| APACHE II Media (puntos) | 15 ± 9.0 | 15 ± 6.0 | PNS |
| TISS media (puntos) | 15.0 ± 5.1 | 17.3 ± 8.7 | PNS |
| DOM media | 1.6 ± 1.0 | 1.8 ± 0.9 | PNS |
| FOM media | 1.0 ± 0.6 | 1.1 ± 1.0 | PNS |

DOM: Disfunciones orgánicas
FOM: Fallas orgánicas, PNS: diferencia no significativa)

datos. Así, ambos grupos A (GA) y B (GB) quedaron integrados por 23 pacientes cada uno. Tres (13%) pacientes del GA y 5 (21,7%) pacientes del GB, se excluyeron por ATB empírico inadecuado. Los grupos quedaron finalmente conformados con 20 pacientes en el GA y 17 pacientes en el GB, sobre los cuales se realizó el presente análisis. En la Tabla 4 se enumeran los diagnósticos de ingreso. La mortalidad global fue 16,21% (6/37), con una incidencia mayor en el GB (29%) respecto del GA (5%) aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (p NS). El nivel medio de gravedad, la edad media, los días de estancia en la UCI, así como el valor medio de TISS, de disfunciones y de fallas orgánicas, no resultaron diferentes entre los grupos (Tabla 5).

CONCLUSIONES

Múltiples son los estudios realizados ensayando nuevas terapias coadyuvantes en el tratamiento de la sepsis de diversos orígenes, con resultados muy contradictorios y nada concluyentes¹²⁻¹⁷.

La identificación de los pacientes sépticos que “verdaderamente” se benefician con las nuevas estrategias de tratamiento de la sepsis es un formidable problema al diseñar un estudio clínico. En general los estudios multicéntricos sobre sepsis, incluyen grupos heterogéneos de pacientes, que difieren en lo referente al sitio de infección, al microorganismo causante, al tipo de paciente (clínico o quirúrgico), al tiempo de evolución del proceso séptico, así como a la patología aguda o enfermedades crónicas presentes. El presente estudio homogeneiza adecuadamente a los pacientes, limitando el sitio de infección (abdominal), el tipo de pacientes (sólo quirúrgicos), la patología aguda (sepsis abdominal) así como el tiempo de evolución del cuadro de sepsis (<24 hs.), ajustándose a lo sostenido por Sibbald y Vincent¹⁸, en la conferencia de consenso de Bruselas (1994) respecto de las condiciones de los ensayos clínicos para el tratamiento de la sepsis.

El principal hallazgo del presente estudio, es haber observado una mortalidad marcadamente inferior en el grupo de pacientes sépticos tratado con Ig polivalente enriquecida con IgM (5%) respecto del grupo control (29%), aunque tal diferencia no fue estadísticamente significativa. También se observó un menor número de disfunciones y de fracasos orgánicos en el grupo activo respecto del control, sin alcanzar significación (Tabla 5). El pequeño número ($n = 37$) de pacientes incluidos en el estudio, explica que dichas diferencias no alcancen significación. Sin embargo, esa diferencia se vuelve significativa en la proyección con una población mayor ($n = 75$). Esto nos

permite sostener que el aporte de Ig polivalente enriquecida con IgM en el tratamiento de la sepsis abdominal podría mejorar el pronóstico y justifica ampliamente continuar con el presente estudio a fin de incluir una mayor población, para validar los presentes hallazgos.

La mayor limitación del estudio es la pequeña población incluida. Respecto de este punto, y al igual que lo sostenido por Douzinas y col.¹⁹, resulta sumamente difícil obtener una gran población de pacientes homogéneos. La implementación de estrictos criterios de inclusión hace dificultosa la incorporación e invariablemente restringe el número de pacientes en estudio. El ánimo del grupo de investigadores al diseñar el estudio, fue intentar la mayor homogeneidad en los pacientes a incluir, para lograr conclusiones válidas. Tal como lo sostienen Foster y Doig²⁰, si bien la heterogeneidad de un estudio (criterios de inclusión menos estrictos), mejora la generalización de los resultados (validación externa), es cierto también, que resulta más difícil demostrar un verdadero efecto del tratamiento, si es que existe (validación interna). Por ello, se considera como regla general de un estudio bien diseñado, que la validación interna nunca debe comprometerse en favor de la validación externa. El presente estudio apunta en esta dirección, jerarquizando la validación interna para obtener conclusiones válidas sobre el papel de la inmunoterapia en la sepsis.

Por otro lado, no existe una terapia probada y estandarizada para el tratamiento de la sepsis, por lo cual no es posible comparar una terapia “control” respecto de algún nuevo tratamiento. Por ello, en los estudios sobre sepsis, las nuevas estrategias son controladas en adición a los tratamientos habituales. Dentro de estos procedimientos habituales se incluyen la infusión de antibióticos (ATB) apropiados y adecuada restitución del volumen intravascular con o sin aporte de inotrópicos y/o vasopresores. Dado que se ha demostrado, que el tratamiento ATB empírico adecuado en la sepsis a gérmenes Gram negativos, reduce en un 50% la posibilidad de shock y la mortalidad²¹, se decidió excluir del presente análisis a aquellos pacientes con ATB empírico inadecuado, a pesar de que luego de los cultivos se haya indicado el ATB según antibiograma, a fin de disminuir al máximo los “factores confundidores”. Respecto de este punto, es de interés lo comunicado por Sprung y col.²². Mediante la utilización de un Comité de Evaluación Clínica, ellos reportaron que de los 553 pacientes incluidos en un estudio multicéntrico sobre sepsis²³, 77 (14%) no reunían los criterios de inclusión/exclusión, y 60 pacientes (10,8%) tenían “eventos confundidores” como el inapropiado uso de ATB.

Por lo expresado hasta aquí, creemos que el presente estudio, probablemente uno de los que más se ajusta en su diseño, a las recomendaciones de la conferencia de consenso¹⁸, aporta datos importantes a un tema muy controvertido. Sus resultados sugieren fuertemente, que la infusión de Ig polivalente enriquecida con IgM (Pentaglobin®) en la sepsis de origen intrabdominal con foco resuelto, reduce la mortalidad de los pacientes al alta de la UCI. Mayor número de pacientes, respetando los estrictos criterios de selección, es necesario para validar estos resultados preliminares.

Agradecimiento

Al Sr. Carlos Rodríguez de Biogan S.A. por la disposición prestada para el desarrollo del estudio.

A la Dra. Sandra Trefler por la ayuda en la confección del manuscrito.

Listado de Colaboradores (orden alfabético)

Ceraso D. (Terapia Intensiva - Hospital Fernández - GCBA)

Esteban M. (Terapia Intensiva - Hospital A. Posadas)

Farina P. (Terapia Intensiva - Hospital Israelita "EZRAH")

Gambino F. (Terapia Intensiva - Hospital Militar Central)

Junk O. (Terapia Intensiva - Sanatorio Otamendi)

Karmazyn C. (Terapia Intensiva - Sanatorio Otamendi)

Marmol R. (Terapia Intensiva - Sanatorio San José)

Mignini M. (Terapia Intensiva - Clínica Bazterrica)

Pachetti P. (Terapia Intensiva - Clínica Bazterrica)

Vetere L. (Terapia Intensiva - Hospital Israelita "EZRAH")

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Ritchie DI, Girotti MJ, Rotstein OD, Teodorczk-Injeyan JA: Impaired antibody production in blunt trauma. *Arch Surg* 1990, 125: 91-96.
2. Moran K, Munster AM: alterations of host defense mechanisms in burned patients. *Surg Clin North Am* 1987, 67: 47-56.
3. Mc Gowan JEJ, Barnes WN, Finland MB: Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972) with special reference to hospital-acquired cases. *J Infect Dis* 1975, 132: 326-341.
4. Zanetti G, Calandra T: Intravenous immunoglobulins and granulocyte colony-stimulating factor for the management of infection in intensive care units. *Current Opinion Crit Care* 1997, 3: 342-347.
5. Dominioni L, Dionigi R, Zanella M et al: Effects of high-dose IgG on survival patients with sepsis scores of 20 or greater. *Arch Surg* 1991, 126: 236-240.
6. Caffero F, Gipponi M, Bonalumi U et al.: Prophylaxis of infection with intravenous immunoglobulins plus antibiotic for patients at risk for sepsis undergoing surgery for colorectal cancer: Results of a randomized, multicenter clinical trial. *Surgery* 1992, 112: 24-31.
7. Gooding A, Bastian J, Peterson B et al: Safety and efficacy of intravenous immunoglobulin prophylaxis in pediatric head trauma patients. A double-blind controlled trial. *J Crit Care* 1993, 8: 212-216.
8. Glinz W, Grob PJ, Nydegger UE et al: Polyvalent immunoglobulins for prophylaxis of bacterial infection in patients following multiple trauma. *Intensive Care Med* 1985, 11: 288-294.
9. Bone R.: Systemic Inflammatory Response Syndrome. A unifying concept of systemic inflammation. En *Sepsis and Multiorgan Failure*. Fein AM- Abraham EM- Balk RA- Bernard GR- Bone RC- Danzker DR- Fink MP. 1997. Williams & Wilkins. Capítulo 1: 3-10.
10. Knaus WA, Drader EA, Douglas PW, et al. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985, 13: 818.
11. Cullen DJ, Civetta JM, Briggs BA, Ferrara LC: Therapeutic interventions scoring system.: A method of quantitative comparison of patients care. *Crit Care Med* 1974, 2: 57-60.
12. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH et al: The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock: A prospective, controlled study. *N Engl J Med* 1984, 311: 1137-1143.
13. Dhainaut JF, Tenaillon A, Le Tulzo Y, et al.: The BN 52021 Sepsis Study Group. Platelet activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Crit Care Med* 1994, 22: 1720-1728.
14. Fisher CJ, Dhainaut JF, Opal SM et al for the Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: results from randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA* 1994, 271: 1836-1843.
15. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al for the TNF Mab Sepsis Study Group. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *JAMA* 1995, 273: 934-941.
16. Pilz G, Fateh-Moghadam S, Viell B et al: Supplemental immunoglobulin therapy in sepsis and septic shock: Comparison of mortality under treatment with polyvalent i.v. immunoglobulin versus placebo - Protocol of multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Theor Surg* 1993, 8: 61-68.
17. Nachbaur D, Herold M, Gachter A, Niederwieser D. Modulation of alloimmune response in vitro by an IgM-enriched immunoglobulin preparation (Pentaglobin). *Immunology* 1998, 94: 279-283.
18. Sibbald WJ, Vincent JL: Round table conference on clinical trials for the treatment of sepsis. Brussels 12-14 March 1994. *Int Care Med* 1995, 21:184-189.
19. Douzinas EE, Pitaridis MT, Louris G, Andrianakis I y col.: Prevention of infection in multiple trauma patients by high-dose intravenous immunoglobulins. *Crit Care Med* 2000, 28: 8-15.
20. Foster DM, Doig GS: Clinical trials for the evaluation of sepsis therapies. En: Vincent JL Edit. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer 1997:149- 157.
21. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR: Gram-negative bacteremia. *Am J Med* 1980, 68: 344-355.
22. Sprung CL, Finch RG, Thijs LG, Glauser MP: International sepsis trial (INTERSEPT): Role and impact of Clinical Evaluation Committee. *Crit Care Med* 1996, 24: 1441-1447.
23. Cohen J, Carlet J for the INTERSEPT Study Group: INTERSEPT: A international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alfa in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1996, 24: 1431-1440.